早期断奶对仔猪空肠和回肠兴奋性氨基酸载体 1 表达的影响[1]

崔一喆[1]　王秋菊[1,2*]　苏　景[3]　李　悦[1]　周亚强[1]　陈　玲[1]

（1. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院，大庆 163319；2. 东北农业大学动物医学学院，哈尔滨 150030；3. 黑龙江省动物疫病预防与控制中心，哈尔滨 150069）

摘　要：本试验旨在研究仔猪出生后 10~20 d，早期断奶仔猪小肠谷氨酸转运载体基因表达情况与哺乳仔猪的差异。试验分别从 40 头不同母猪的仔猪中各选出体重相近，10 日龄的“杜×长×大”三元杂交仔猪 1 头，共 40 头仔猪，随机不配对分为 2 组，每组 20 头仔猪，对照组（哺乳组）为哺乳仔猪，随母猪喂养；试验组（断奶组）为断奶仔猪，隔离断奶饲养；试验期 10 d。饲养结束，每组随机取 12 只仔猪，宰杀取空肠和回肠，测定谷氨酸转运载体兴奋性氨基酸转运载体 1（EAAC1）蛋白质表达情况和游离氨基酸含量。结果显示，断奶显著降低了仔猪空肠和回肠 EAAC1（57 和 73 ku）及其相关蛋白谷氨酸转运联合蛋白（GTRAP3-18）（50 ku）的蛋白质和基因表达量（P<0.05）。断奶提高了仔猪空肠游离谷氨酸和总氨基酸含量，却降低了仔猪回肠游离谷氨酸和总氨基酸含量，差异显著（P<0.05）。结果提示，早期断奶降低 EAAC1 和 GTRAP3-18 的蛋白质含量，这可能与早期断奶仔猪遭受营养谷氨酸缺乏导致的肠道氨基酸吸收转运障碍有关。

关键词：仔猪；断奶；谷氨酸转运载体；EAAC1；小肠

中图分类号：S828　　　　文献标识码：　　　　　　文章编号：

谷氨酸（Glu）作为动物黏膜主要的能源物质之一，是仔猪断奶时的条件性必需氨基酸[1]，对仔猪生长发育及肠道黏膜生长和修复起关键作用。谷氨酸在肠道中不能被动吸收，必须依靠转运载体进行主动运输。兴奋性氨基酸转运体家族（excitatory amino acid transporters，EAATs）是钠离子（Na^+）依赖的高亲和力的谷氨酸转运载体[2]，对维持神经系统中的谷氨酸平衡起重要作用。其中的兴奋性氨基酸转运载体 1（excitatory amino acid carrier 1，EAAC1）

收稿日期：2015-09-01

基金项目：黑龙江省自然科学基金项目（C201444，C2015040）；黑龙江八一农垦大学校内课题资助（XZR2014-05）；中国博士后科学基金项目（2013M531011）

作者简介：崔一喆（1979-），男，黑龙江鸡西人，博士，研究方向为动物肠道疾病及营养调控。E-mail：cuiyizhe1979@126.com

*通信作者：王秋菊，副教授，E-mail： wqj_9@163.com

是 EAATs 家族中最重要的一个谷氨酸转运载体，不仅因为 EAAC1 在神经系统中转运谷氨酸的速度是其他转运载体转运速度的近 10 倍[3]，而且 EAAC1 不是神经系统特异的，也存在于一些非神经组织中，如小肠等。*EAAC*1 的表达受到谷氨酸转运联合蛋白（glutamate transporter associate protein 3-18，GTRAP3-18）的负调节作用。在人类的癌症和癫痫病中发现，GTRAP3-18 通过与 EAAC1 的 C 末端连接以抑制 EAAC1 对谷氨酸的转运，造成神经系统中谷氨酸中毒[4]。且 GTRAP3-18 仅与 EAAC1 结合并对其调节，与其他 EAATs 不发生作用[5]。*EAAC*1 的表达受到 *GTRAP*3-18 表达量的调节。多数关于 EAAC1 的研究集中在神经系统中，肠道中的研究较少。有研究显示 *EAAC*1 基因缺失小鼠表现出年龄依赖性黑质多巴胺能神经元的损失和氧化应激的增加[6]，且在阿尔茨海默氏病患者海马神经元中发现异常 EAAC1 积聚[7]。Fu 等[8]2012 年首次克隆哺乳仔猪空肠 *EAAC*1，并确定在哺乳仔猪空肠中，*EAAC*1 的表达量是变化的，且低初生重的仔猪空肠中 *EAAC*1 的表达量很低。以上研究均说明 *EAAC*1 的表达量与机体非正常发育或所处的应激及疾病状态息息相关。低的 *EAAC*1 表达量将影响谷氨酸的转运效率继而影响仔猪小肠的黏膜发育和吸收功能[8]。断奶是仔猪生理应激过程，失去母源谷氨酸的摄取，小肠中 *EAAC*1 的表达变化是怎样的尚不得知。因此，本试验在前人研究的基础上，以哺乳仔猪为对照，通过研究断奶时仔猪回肠和空肠中 *EAAC*1 及其调节蛋白 *GTRAP*3-18 表达的变化，说明断奶应激对 *EAAC*1 表达的影响作用，为进行仔猪断奶时肠黏膜损伤修复机制研究和提高仔猪断奶前后生长质量提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物分组与饲养管理

试验于 2010 年 5 月在黑龙江省齐齐哈尔市养猪示范基地进行。分别从 40 头不同母猪的仔猪中各选出平均体重为（4.48±0.26） kg、10 日龄的“杜×长×大”三元杂交仔猪 1 头，共 40 头仔猪，采用单因素试验设计，随机分为 2 组，每组 20 个重复，每个重复 1 头猪。饲养期 10 d。

哺乳组仔猪在哺乳仔猪舍随母猪继续哺乳 10 d；断奶仔猪在保育仔猪舍饲养，饲喂玉米-豆粕型商业断奶饲粮 10 d，每日早、中、晚饲喂 3 次，自由饮水。基础饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（干物质基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet (DM basis)　　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
乳糖 Lactose	15.00
葡萄糖 Glucose	8.52
玉米 Corn	15.95
豆粕 Soybean meal	56.00
玉米油 Corn oil	0.80
石灰石 Limestone	1.05
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.58
碘盐 Iodized salt	0.50
预混料 Premix	0.50
林可霉素 Lincomycin antibiotic	0.10
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels	
粗蛋白质 CP	26.0
消化能 DE/（MJ/kg）	14.27
总磷 P	0.92
钙 Ca	0.68
钙/磷 Ca/P	0.74
精氨酸 Arginine	1.87
组氨酸 Histidine	0.69
异亮氨酸 Isoleucine	1.16
亮氨酸 Leucine	2.07
赖氨酸 Lysine	1.63
蛋氨酸 Methionine	0.37
半胱氨酸 Cysteine	0.42

苯丙氨酸 Phenylalanine	1.28
酪氨酸 Tyrosine	0.99
苏氨酸 Threonine	1.02
色氨酸 Tryptophan	0.35
缬氨酸 Valine	1.22

预混料为每千克饲粮提供 Premix provided the following per kg of diet：Fe 180 mg，Zn 195 mg，Cu 76.8 mg，Mn 260.0 mg，Se 0.30 mg，I 0.5 mg，Co 0.3 mg，VA 13 500 IU，VD 11 250 IU，VE 15 mg，VK 33 mg，VB_1 1.5 mg，VB_2 4.5 mg，VB_6 1.5 mg，VB_{12} 0.018 mg，烟酸胺 niacin amine 18 mg，泛酸钙 calcium pantothenate 9.6 mg，叶酸 folic acid 0.3mg，生物素 biotin 0.06 mg。

断奶仔猪猪舍为封闭式，通风良好，水泥地面；采用单栏隔离饲养，每栏 1 头仔猪；栏内一角上方距地面 0.8 m 处悬挂红外取暖灯，灯下地面铺一块 0.5 m×1.0 m 的吸热板，以保证仔猪温暖。

1.2 试验样品采集与处理

饲养试验结束，第 11 日清晨，从各组中随机选取 12 头，共计 24 头。打开仔猪腹腔，将空肠和回肠取出，立即用冰生理盐水冲洗小肠内部，并从每段肠的中间取样，液氮冷冻保存[5]。冷冻后的肠段样品，用研钵在液氮存在的条件下研磨成粉末状，保存在-80 ℃。

1.3 样品制备

组织匀浆：称取约 1.3 g 粉末状的冷冻的小肠组织样品，按照 1 g 样品 20 mL 匀浆缓冲液的比例，用冷藏的含有蛋白酶抑制剂的匀浆缓冲液将样品解冻，并用多层匀浆仪将样品匀浆。匀浆时，每个样品 16 000 r/min 匀浆 3 min，且每隔 1 min，停顿 20 s。匀浆后的样品，称量并记录匀浆液的总体积，取 2 mL 匀浆液样品于-80 ℃超低温冷冻保存。

细胞内质：采用镁离子（Mg^{2+}）沉淀反应和 4 ℃差异离心的方法制备细胞内质样品[5]。

细胞顶膜：将余下的细胞内质样品继续差异离心制备顶膜样品。

1.4 仔猪谷氨酸转运载体表达的测定

1.4.1 蛋白质表达量的测定[6]

蛋白质含量的测定：使用牛血清蛋白（级分Ⅳ）作为蛋白质标准，测定组织匀浆、细胞内质和顶膜样品中蛋白质的含量。

蛋白质印迹法（Western-blot）测定：制得蛋白质含量为 1 μg/μL 的样品，以肌动蛋白（*β-actin*）为持家基因对照进行 Western-blot。*EAAC*1 一抗为羊抗人 *EAAC*1 多克隆抗体（Sc-7761，圣克鲁斯生物国际有限公司），1：2000 稀释；*GTRAP*3-18 一抗为鼠抗人 *GTRAP*3-18 多克隆抗体（H00010550-A01，Abnova 公司），1：2000 稀释；*β-actin* 一抗用鼠抗人单克隆抗体（Bio-rad 公司），1:10 000 稀释；二抗均用兔抗人免疫球蛋白 G（*IgG*）抗体（Bio-rad 公司），1:10 000 稀释。

1.4.2　基因表达量的测定

寡聚核苷酸引物的设计：采用 Primer 5.0 软件对目的基因和持家基因的扩增引物进行设计，基因引物核酸序列参照 GenBank cDNA 序列（表 2），由 Invitrogen 公司合成。为避免扩增物被非特异性的基因组 DNA 污染，所有仔猪样品的 mRNA 序列都用 Spidey 软件与对应的猪基因序列拟合，并使所有引物含有 2 个外显子区域。

表 2　引物序列和产物大小

Table 2　Primer sequence and product size

基因 Gene	引物 Primer	大小 Size/bp	GenBank 登录号 GenBank accession No.
兴奋性氨基酸转运载体 1 *EAAC*1	F：5’-CAAACTGGGCCTTTACATGG-3’	169	AY195622
	R：5’-TGTTGCTGAACTGGAGGAGA-3’		
谷氨酸转运联合蛋白 *GTRAP*3-18	F：5’-CTGGTATTCACGGGCTTTGT-3’	131	NM_001048073
	R：5’-CCCCCAAACATGGATATGAG-3’		
肌动蛋白	F：5′-GGATGCAGAAGGAGATCACG-3′	150	AY550069

β-actin	R：5′-ATCTGCTGGAAGGTGGACAG-3’

RNA 的制备：通过 TRIzol 试剂（Invitrogen 公司）提取组织样品中的总 RNA[6]，经 DNA 酶（Invitrogen 公司）处理后，用 iScript cDNA 合成试剂盒，根据试剂盒的说明，合成 cDNA。

实时荧光定量（RT）-PCR 检测：采用 25 μL 反应体系，体系组成参见 iQ SYBR Green Supermix RT-PCR 试剂盒（Qiagen 有限公司）说明书。

RT-PCR 的操作程序为：反转录程序（50 ℃，30 min）；蛋白变性程序（95 ℃，15 min）；扩增和量化程序，重复 45 个循环（95 ℃变性 15 s，54 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 15 s）；熔解曲线程序（60~99 ℃，以 0.1 ℃/s 的速度加热，且进行荧光测量）。

数据计算：目的基因与持家基因相对表达量比值的计算公式如下。

$$R=2\text{-}Ct(\text{目的基因-持家基因})。$$

式中：R 表示目的基因的相对表达比值，Ct 表示阈值的循环数。

在这个循环数下，目的基因和持家基因都被扩增了 30 个荧光单位以上。最佳的 RT-PCR 效率是根据公式 $10^{(-1/\text{斜率})}$使得 RNA 连续的稀释扩增得到的，且该值在目的基因和β-actin 上数值是一致的。

1.5　仔猪小肠组织中游离氨基酸含量的测定

采用高效液相色谱仪（带二元溶剂洗脱体系和自动进样器）、数据工作站、荧光检测器、分析柱（高效 C18）进行测定。

1.6　数据计算与统计分析

本试验中蛋白质水平的表达量实际为目的蛋白的相对表达量。经 Western blot 分析得到的蛋白印迹，通过 Quantity One 软件（Bio-Rad）进行印迹扫描，将印迹换算成密度值，用目的蛋白/β-actin 印迹密度的比值作为目的蛋白的相对含量进行计算。

采用 SAS 9.0 软件中单因素方差分析（one-way ANOVA）进行单因素方差分析。试验数据以平均值±标准误或混合平均标准误表示。$P<0.05$ 视为差异显著。结果采用 Fig.P 曲线拟合软件绘制柱状图和曲线图。

2　结果与分析

2.1 断奶对仔猪生长性能的影响

由表 3 可见，在 10 d 的饲养试验期间，断奶组仔猪的平均日采食量为(148.50±16.90) g/d，料重比为 3.58±2.34，与哺乳组仔猪相比，断奶组仔猪的末重显著降低（*P*<0.05），同时断奶组仔猪的平均日增重极显著降低（*P*<0.01）。早期断奶对仔猪的生长性能具有显著的影响。

表 3 断奶对仔猪生长性能的影响

Table 3 Effect of weaning on growth performance of piglets （*n*=20）

项目 Items	哺乳组 Suckling group	断奶组 Weaning group	SEM
初重 Initial body weight/kg	4.18	4.77	0.16
末重 Terminal body weight/kg	7.68	5.19*	0.24
平均日增重 Average daily gain/（g/d）	350	41.50**	24.49
平均日采食量 Average daily feed intake/（g/d）	-	148.50	16.90
料重比 F/G	-	3.58	2.34

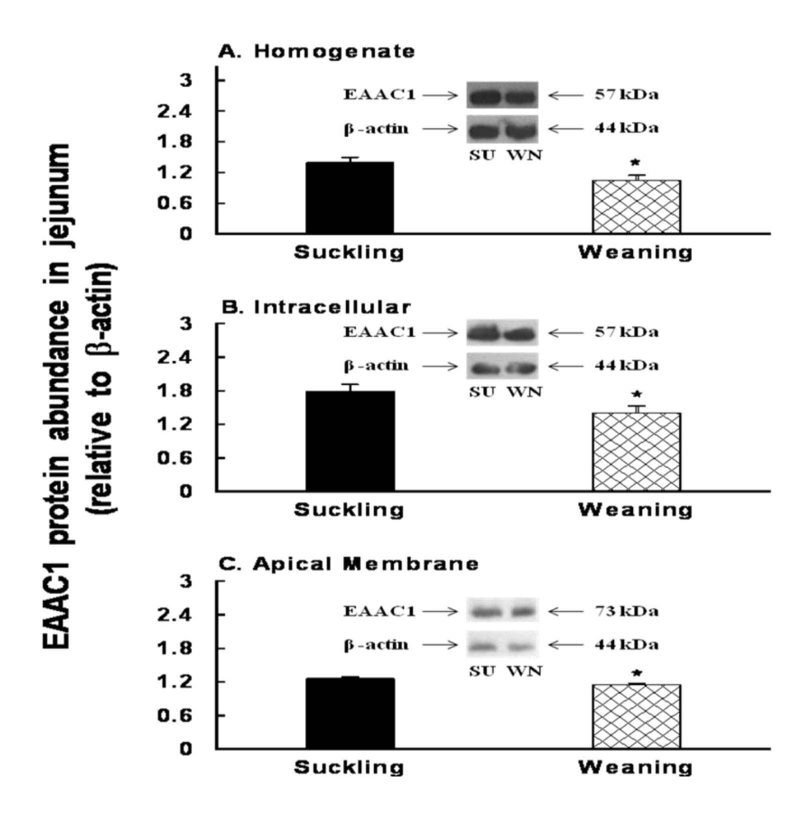
*表示与哺乳组相比差异显著（*P*<0.05），**表示与哺乳组相比差异极显著（*P*<0.01）。下表同。

* means significant difference compared with the suckling group （*P*<0.05）. ** means significant difference compared with the suckling group （*P*<0.01）. The same as below.

2.2 早期断奶对仔猪小肠 EAAC1 蛋白质表达及 mRNA 水平的影响

2.2.1 早期断奶对仔猪小肠 EAAC1 蛋白质表达的影响

采用 Western blot 分析方法，成功地从仔猪小肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中检测到 EAAC1 蛋白质，并分析其含量，结果检测到 EAAC1 蛋白质在小肠组织匀浆和细胞内质中的分子量为 57 ku；EAAC1 蛋白质在小肠细胞顶膜中的分子量为 73 ku。以 β-actin 为参照量，与哺乳仔猪相比较，断奶仔猪空肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中 EAAC1 蛋白质含量较哺乳仔猪分别降低了 25%、21%和 9%，差异显著（*P*<0.05），如图 1 所示。断奶仔猪回肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中 EAAC1 蛋白质含量分别降低了 32%、22%和 14%，差异显著（*P*<0.05），如图 2 所示。本结果显示，EAAC1 蛋白质在仔猪小肠组织中存在，且受早期断奶的影响，含量降低。



*表示与哺乳组相比差异显著（P<0.05）。下图同。

* means significant difference compared with the suckling group （P<0.05）. The same as below.

图 1　仔猪空肠中 EAAC1 蛋白质表达量

Fig.1　EAAC1 protein abundance in jejunum of piglets

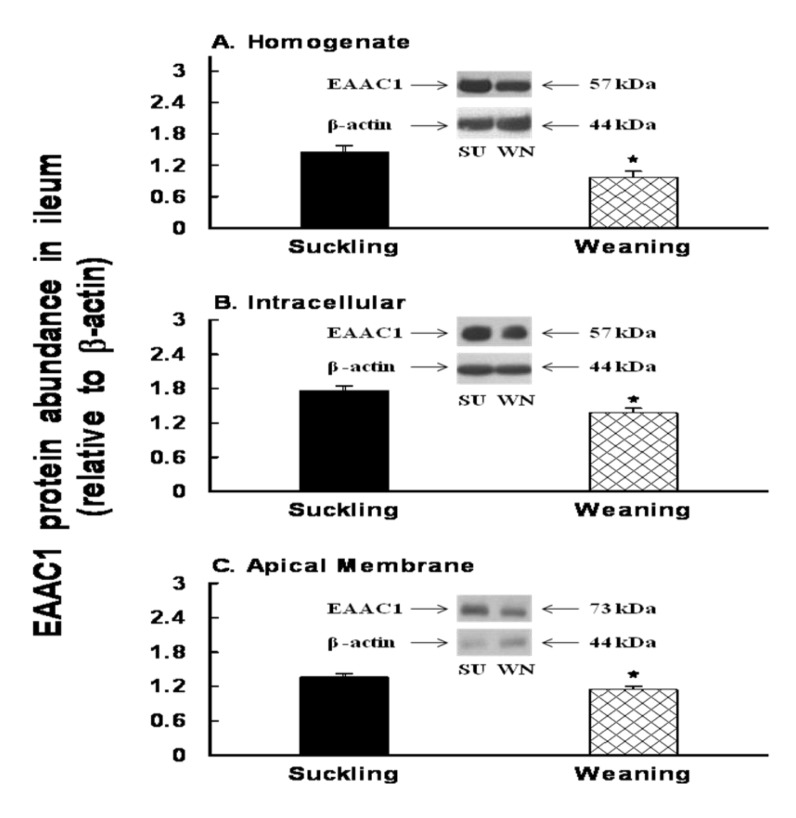


图 2　仔猪回肠中 EAAC1 蛋白质表达量

Fig.2　EAAC1 protein abundance in ileum of piglets

2.2.2　早期断奶对仔猪小肠 *EAAC*1 mRNA 表达量的影响

断奶与哺乳仔猪小肠组织中*EAAC*1 mRNA表达量分析结果如表4所示。以*β-actin*为参照量，与哺乳组仔猪相比较，断奶组仔猪空肠中*EAAC*1 mRNA表达量降低了88%，差异显著（P<0.05）；断奶组仔猪回肠中*EAAC*1 mRNA表达量降低了73%，差异显著（P<0.05）。

表4　仔猪小肠中EAAC1 mRNA水平

Table 4　Intestinal EAAC1 mRNA aboudance (relative to β-actin) in piglets　（n=12）

项目 Items	哺乳组 Suckling group	断奶组 Weaning group	SEM
空肠 Jejunum	0.020 1	0.002 4*	0.0026
回肠 Ileum	0.017 9	0.004 8*	0.0026

Pearson相关分析结果显示，断奶组与哺乳组仔猪空肠组织匀浆（r=0.52，P=0.042，n=24），细胞内质（r=0.56，P=0.021，n=24）和细胞顶膜（r=0.49，P=0.008，n=24）中EAAC1蛋白质含量与空肠组织中*EAAC*1 mRNA表达量之间呈正向线性关系（P<0.05）；且空肠组织匀浆EAAC1蛋白质与细胞内质EAAC1蛋白质及细胞内质EAAC1蛋白质与细胞顶膜EAAC1蛋白质之间的变化均呈正向线性关系，且差异显著（P<0.05）。断奶组仔猪与哺乳组仔猪的回肠组织匀浆（r=0.51，P=0.021，n=24）、细胞内质（r=0.51，P=0.016，n=24）、细胞顶膜（r=0.41，P=0.016，n=24）中EAAC1蛋白质含量与回肠组织中*EAAC*1 mRNA表达量之间呈正向线性关系（P<0.05）。且回肠组织匀浆EAAC1蛋白质与细胞内质EAAC1蛋白质及细胞内质EAAC1蛋白质与细胞顶膜EAAC1蛋白质之间的变化均成正向线性关系，且差异显著（P<0.05）。

2.3　早期断奶对仔猪小肠 GTRAP3-18 蛋白质表达及 mRNA 水平的影响

2.3.1　早期断奶对仔猪小肠 GTRAP3-18 蛋白质表达的影响

在空肠和回肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中检测到分子量为50 ku的GTRAP3-18蛋白质，如图4和图5所示。以β-actin为参照量，与哺乳仔猪相比较，断奶仔猪空肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中GTRAP3-18蛋白质含量分别降低了15%、28%和55%，差异显著

（*P*<0.05）；与哺乳仔猪相比较，断奶仔猪回肠组织匀浆、细胞内质和细胞顶膜中GTRAP3-18蛋白质含量分别降低了16%、7%和27%，差异显著（*P*<0.05）。

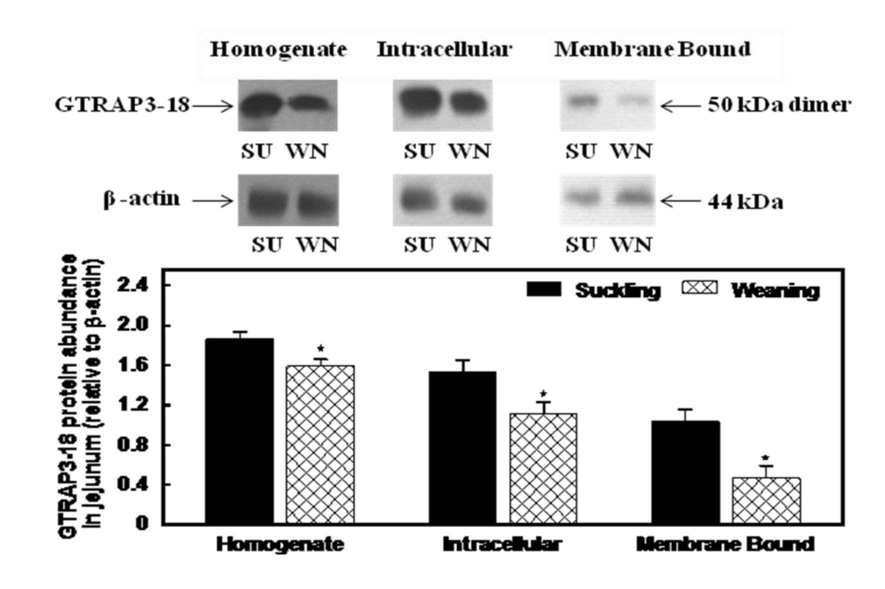


图 3　仔猪空肠中 GTRAP3-18 的蛋白质表达量

Fig.3　GTRAP3-18 protein abundance in jejunum of piglets

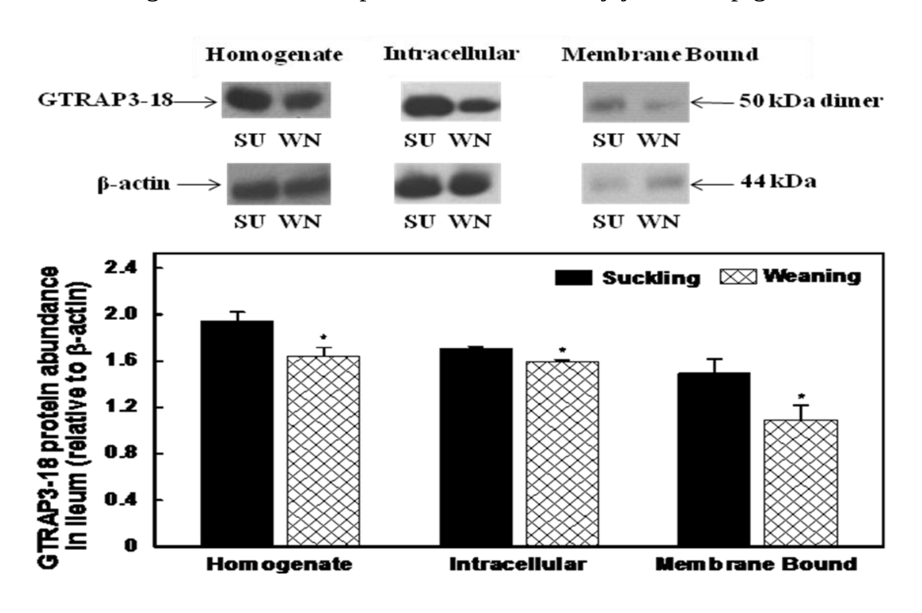


图 4　仔猪回肠中 GTRAP3-18 蛋白质表达量

Fig.4　GTRAP3-18 protein abundance in ileum of piglets

2.3.2　早期断奶对仔猪小肠 *GTRAP*3-18 mRNA 水平的影响

断奶与哺乳仔猪小肠组织中 *GTRAP*3-18 mRNA 表达量分析结果如表 5 所示。以 β-actin 为参照量，与哺乳组仔猪相比较，断奶组仔猪空肠中 *GTRAP*3-18 mRNA 表达量降低了 70%，差异显著（*P*<0.05）；回肠中 *GTRAP*3-18 mRNA 的相对表达量降低了 52%，差异显著

（P<0.05）。

表5　仔猪小肠中*GTRAP*3-18 mRNA表达量

Table 5　Intestinal *GTRAP*3-18 mRNA aboudance in piglets (n=12)

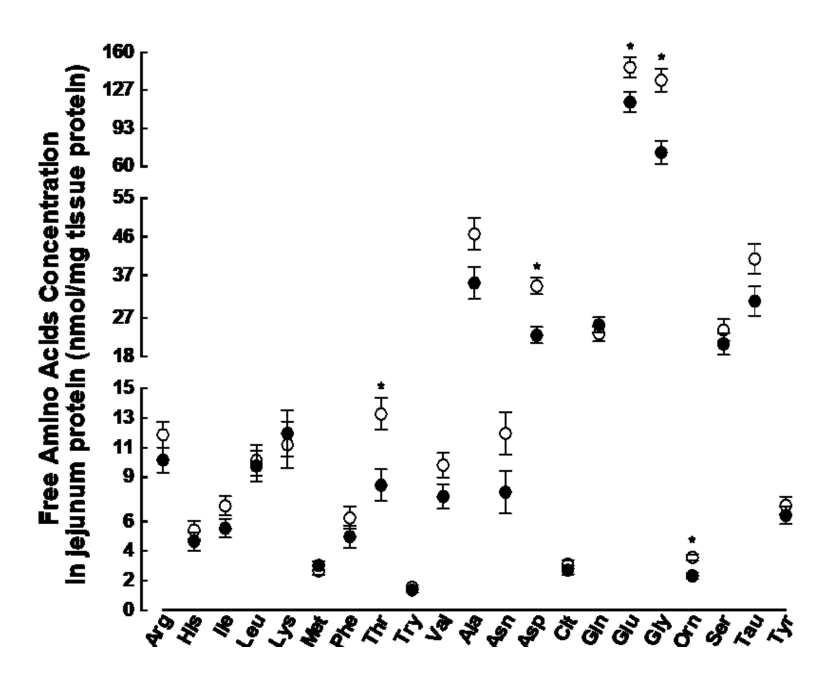
项目 Items	哺乳组 Suckling group	断奶组 Weaning group	SEM
空肠 Jejunum	0.006 7	0.002 0*	0.001 0
回肠 Ileum	0.005 6	0.002 7*	0.000 7

Pearson 相关分析结果显示，断奶组仔猪和哺乳组仔猪空肠组织匀浆（r=0.33，P=0.027，n=24），细胞内质（r=0.54，P=0.019，n=24），细胞顶膜（r=0.56，P=0.028，n=24）的 GTRAP3-18 蛋白质表达量与空肠中 *GTRAP*3-18 mRNA 水平之间呈正向线性关系（P<0.05）；且空肠组织匀浆 GTRAP3-18 蛋白质与细胞内质和细胞顶膜 GTRAP3-18 蛋白质及细胞内质 GTRAP3-18 蛋白质与细胞顶膜 GTRAP3-18 蛋白质表达量之间均呈正向线性关系，且差异显著（P<0.05）。回肠组织匀浆（r=0.42，P=0.014，n=24）、细胞内质（r=0.42，P=0.047，n=24）、细胞顶膜（r=0.15，P=0.029，n=24）GTRAP3-18 蛋白质表达量与回肠中 *GTRAP*3-18 mRNA 水平之间呈正向线性关系（P<0.05）。且回肠组织匀浆 GTRAP3-18 蛋白质与细胞内质和细胞顶膜 GTRAP3-18 蛋白质及细胞内质 GTRAP3-18 蛋白质与细胞顶膜 GTRAP3-18 蛋白质表达量之间均成正向线性关系，且差异显著（P<0.05）。

2.4　早期断奶对仔猪游离氨基酸含量的影响

2.4.1　早期断奶对仔猪空肠中游离氨基酸含量的影响

与哺乳组仔猪相比较，作为 EAAC1 蛋白质的底物氨基酸，空肠中谷氨酸含量提高了 26%，差异显著（P<0.05）；作为抗系统 ASC 氨基酸转运蛋白 2(ASCT2)蛋白质的底物氨基酸，谷氨酰胺含量没有显著变化（P >0.05），其他游离氨基酸，苏氨酸、甘氨酸和鸟氨酸含量分别提高了 57%、88%和 53%，差异显著（P<0.05）（图 5）。



●：哺乳组；○：断奶组。下图同。

●: suckling group; ○: weaning group. The same as below.

图 5　断奶对仔猪空肠中游离氨基酸含量的影响

Fig.5　Effects of weaning on free amino acids content in jejunum of piglets

2.4.2　早期断奶对仔猪回肠中游离氨基酸含量的影响

与哺乳仔猪相比较，断奶仔猪回肠中游离氨基酸含量的变化趋势与空肠中游离氨基酸含量的变化趋势相反。作为 EAAC1 转运蛋白的底物氨基酸，谷氨酸降低了 43%，与哺乳仔猪相比，差异显著（P<0.05）；ASCT2 转运蛋白的底物氨基酸谷氨酰胺降低了 52%，显著低于哺乳组（P<0.05）；其他氨基酸，赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、精氨酸、牛磺酸和酪氨酸含量都降低了 42%以上，差异显著（P<0.05）（图 6）。

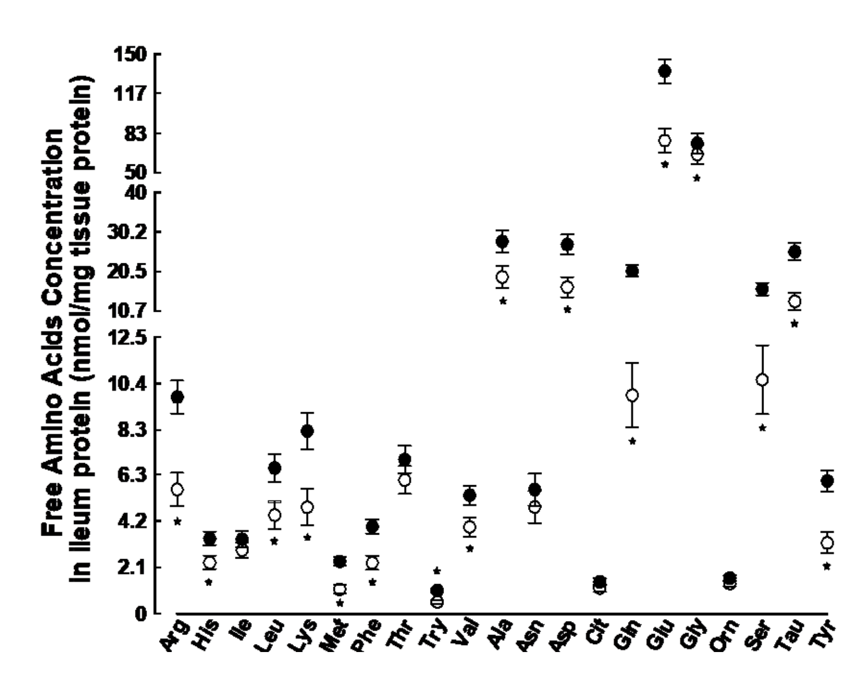


图 6　断奶对仔猪回肠中游离氨基酸含量的影响

Fig.6　Effects of weaning on free amino acids content in ileum of piglets

3　讨　论

仔猪断奶诱发了复杂的形态和功能变化，涉及营养、消化代谢[9]、应激、神经内分泌[10]、基因功能等。断奶后日增重是仔猪生长的一个重要表观指标，与哺乳仔猪相比，若未受到断奶影响，则说明日粮营养供给足够仔猪需要，仔猪适应从母乳到饲料的变化，并且肠道发育也适应饲料采食。但在实际生产中，断奶时有 10%的仔猪死于这种生理应激，一方面离开母猪的外环境应激，另一方面就是从母乳到饲料对肠道内环境和黏膜发育的应激。断奶应激不仅引起胃肠道功能的改变，而且还会影响到脑-肠轴功能的调节[11]。仔猪在断奶过程中，由于营养条件和环境的改变，引起仔猪的采食量下降。因此与正常哺乳的幼畜相比，由于仔猪胃肠道未发育成熟，断奶会导致仔猪生的长性能降低。在本研究中，早期断奶仔猪显示出明显的断奶应激症状，断奶仔猪的平均日采食量为 148.5 g，明显低于 NRC（1998）饲养标准中 240 g/d 的平均日采食量，断奶仔猪的平均日增重明显低于同期哺乳组仔猪。Gu 等[12]研究表明仔猪在断奶时，断奶应激引起肠道结构和功能的巨大变化，直接影响着仔猪肠道的消化与吸收功能，进而影响仔猪的生长发育。

EAAC1 是最主要的谷氨酸转运载体，它广泛地分布于整个细胞体。目前为止，很多的

研究都集中 EAAC1 在中枢神经系统的谷氨酸转运上，很少有 EAAC1 在仔猪小肠黏膜表达的研究报道。本试验通过研究早期断奶仔猪肠道组织 EAAC1 蛋白质表达量及其 mRNA 水平的变化，揭示断奶对谷氨酸转运的影响。试验结果显示，早期断奶明显降低了仔猪小肠 EAAC1 蛋白质表达量和 mRNA 水平。Watabe 等[13]用 HEK293 细胞为模式研究并证明，GTRAP3-18 反向调节 EAAC1 的活性和细胞内谷胱甘肽的含量，并顺次影响对氧化应激的易感性。分化、热应激和氧化应激都会提高人体内 GTRAP3-18 蛋白质的分离[12]，即 GTRAP3-18 蛋白质表达量或 mRNA 水平在遇到氧化应激时都应该升高，而不是降低。本试验结果显示，早期断奶降低了 GTRAP3-18 在仔猪空肠和回肠组织中的蛋白质表达量及其 mRNA 水平，也就是说，断奶应激在仔猪肠道组织中表现的反应结果与热应激等氧化应激不一致。断奶仔猪遭受生理应激，需要从饲粮中摄取更多的保护肠黏膜的谷氨酸。有研究显示，谷氨酸摄取效率提高时会引起 GTRAP3-18 蛋白质表达量的降低[14]。本试验结果显示，断奶仔猪空肠中谷氨酸浓度升高，同时伴随断奶仔猪空肠 GTRAP3-18 蛋白质表达量降低，与 Lin 等[14]的研究结论一致；然而断奶仔猪回肠中谷氨酸含量却降低，GTRAP3-18 表达量也降低，关于 GTRAP3-18 在应激或疾病中起的具体作用及机制还不明确，有待进一步研究[5]。

谷氨酸为兴奋性氨基酸，可被 EAAC1 转运。本试验结果显示，早期断奶仔猪回肠组织中游离谷氨酸含量明显降低，与此相反，游离谷氨酸含量在空肠组织中却明显增加。有研究显示，EAAC1 在小肠中的表达主要是在空肠中[15]，而且小肠中谷氨酸跨膜转运的效率和能力由 EAAC1 表达的变化进行调控[16]。因此我们推测，断奶仔猪空肠组织中大量的 EAAC1 转运游离谷氨酸，以提高机体对谷氨酸的摄取量，与此同时 EAAC1 被消耗，表达水平降低；而回肠组织中 EAAC1 表达量少，对谷氨酸转运效率相对低，因此与哺乳仔猪相比，断奶仔猪回肠中游离谷氨酸降低。当然谷氨酸含量的变化不仅与其转运相关，同时还受到谷氨酸-谷氨酰胺循环的影响。

4 结 论

总的来说，受到早期断奶应激，仔猪空肠组织膜上 *EAAC*1 表达量降低，消耗的 EAAC1 提高了对断奶仔猪空肠中谷氨酸的转运，提高了空肠中谷氨酸等游离氨基酸的含量，并伴随

了 EAAC1 调节蛋白 GTRAP3-18 表达量的降低；而断奶仔猪回肠组织膜上 *EAAC*1 表达量降低的同时，其对谷氨酸转运的效率和能力也降低，导致回肠谷氨酸等游离氨基酸含量下降。

参考文献：

[1] RUTH M R,FIELD C J.The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue[J].Journal of Animal Science and Biotechnology,2013,4:27.

[2] BIANCHI M G,BARDELLI D,CHIU M,et al.Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease[J].Cellular and Molecular Life Sciences,2014,71(11):2001–2015.

[3] AOYAMA K,NAKAKI T.Neuroprotective properties of the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1)[J].Amino Acids,2013,45(1):133–142.

[4] BUTCHBACH M E R,LAI L,LIN C L G.Molecular cloning,gene structure,expression profile and functional characterization of the mouse glutamate transporter (eAAT3) interacting protein GTRAP3–18[J].Gene,2002,292(1/2):81–90.

[5] AOYAMA K,NAKAKI T.Inhibition of GTRAP3–18 May Increase Neuroprotective Glutathione (GSH) Synthesis[J].International Journal of Molecular Sciences,2012,13(9):12017–12035.

[6] BERMAN A E,CHAN W Y,BRENNAN A M,et al.N-acetylcysteine prevents loss of dopaminergic neurons in the $EAAC1^{-/-}$ mouse[J].Annals of Neurology,2011,69(3):509–520.

[7] DUERSON K,WOLTJER R L,MOOKHERJEE P,et al.Detergent-insoluble EAAC1/EAAT3 aberrantly accumulates in hippocampal neurons of Alzheimer's disease patients[J].Brain Pathology,2009,19(2):267–278.

[8] FU D Z,YANG H S,KONG X F,et al.Molecular cloning and expression profiling of excitatory amino acid carrier 1 in suckling Huanjiang mini-piglets with large or small body

weight at birth[J].Molecular Biology Reports,2013,40(4):3341–3350.

[9] TAKITA M,KIKUSUI T.Early weaning influences short-term synaptic plasticity in the medial prefrontal–anterior basolateral amygdala pathway[J].Neuroscience Research,2015,doi:10.1016/j.neures.2015.08.003.in press

[10] XIONG X,YANG H S,TAN B,et al.Differential expression of proteins involved in energy production along the crypt-villus axis in early-weaning pig small intestine[J].American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,2015,309(4):G229–G237.

[11] CANDEIAS E M,SEBASTIÃO I C,CARDOSO S M,et al.Gut-brain connection:the neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide[J].World Journal of Diabetes,2015,6(6):807–827.

[12] GU X H,LI D F,SHE R P.Effect of weaning on small intestinal structure and function in the piglet[J].Archiv für Tierernaehrung,2002,56(4):275–286.

[13] WATABE M,AOYAMA K,NAKAKI T.A dominant role of GTRAP3–18 in neuronal glutathione synthesis[J].The Journal of Neuroscience,2008,28(38):9404–9413.

[14] LIN C I,ORLOV I,RUGGIERO A M,et al.Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18[J].Nature,2001,410(6824):84–88.

[15] BURRIN D G,Stoll B.Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut[J].American Journal of Clinical Nutrition,2009,90(3):850S–856S.

[16] FAN M Z,MATTHEWS J C,ETIENNE N M P,et al.Expression of apical membrane L-glutamate transporters in neonatal porcine epithelial cells along the small intestinal crypt-villus axis[J].American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology,2004,287(2):G385–G398.

Effects of Early Weaning on Jenunal and Ileal Excitary Amino Acid Aarrier 1 Expression of Piglets

CUI Yizhe[1] WANG Qiuju [1,2*] SU Jing[3] LI Yue[1] ZHOU Yaqiang[1] CHEN Ling[1]

(1. *College of Animal Science and Veterinary*, *Heilongjiang Bayi Agricultural University*, *Daqing* 163319. *China*; 2. *College of Veterinary Medicine*, *Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030, *China*; 3. *Heilongjiang Province Animal Epidemic Prevention and Control Center*, *Harbin* 150069, *China*）

Abstract: This study was conducted to examine the effects of early weaning on adaptive changes in glutamate transporter gene expression in comparison with the suckling counterpart in the pig during the ages of 10 to 20 days. A total of 40 ternary hybrid piglets, with a similar body weight randomly taken from 40 different sows at 10 days of age, were divided into 2 groups. The trial group were 20 suckling piglets randomly obtained from 20 different sow litters, were allowed to continue suckling with their sows as the suckling group for 10 days; the 20 piglets of the weaning group were taken from another 20 different sow litters, moved off-site and weaned on a weaning diet for 10 days according to standard swine industry early weaning practices. At the end of the trial, 12 piglets were randomly taken from each group to remove the jejunum and ileum, and gene expression of excitatory amino acid carrier 1 (*EAAC*1) and free amino acids content were determined. The results showed that weaning significantly decreased the abundance of the EAAC1 (57 and 73 ku) and glutamate transporter associate protein 3-18 (GTRAP3-18) (50 ku) protein and RNA expression in jejunum and ileum of piglets (P<0.05). Weaning significantly increased the contents of glutamate and total free amino acids (P<0.05), while the contents of glutamate and total free amino acids in ileum were significantly decreased (P<0.05). In conclusion, early weaning decrease jejunal and ileal EAAC1 and GTRAP3-18 protein expression and this may, in part, be related to early weaned piglets suffered from lack of nutrition leading to intestinal glutamate uptake disorder.

Key words: piglet; weaning; glutamate transporter; EAAC1; small intestine

*Corresponding author, associate professor, E-mail： wqj_9@163.com （责任编辑 武海龙）